

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 701**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2015 PCT/EP2015/059441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15166016**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2015 E 15725239 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 3137475**

54 Título: **Purificación de epidaunorubicina**

30 Prioridad:

**30.04.2014 DE 102014208194**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.10.2018**

73 Titular/es:

**MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE  
SPEZIALPRÄPARATE MBH (100.0%)**

**Theaterstrasse 6  
22880 Wedel, DE**

72 Inventor/es:

**BINDERNAGEL, HOLGER y  
KUNNARI, TERO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 686 701 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

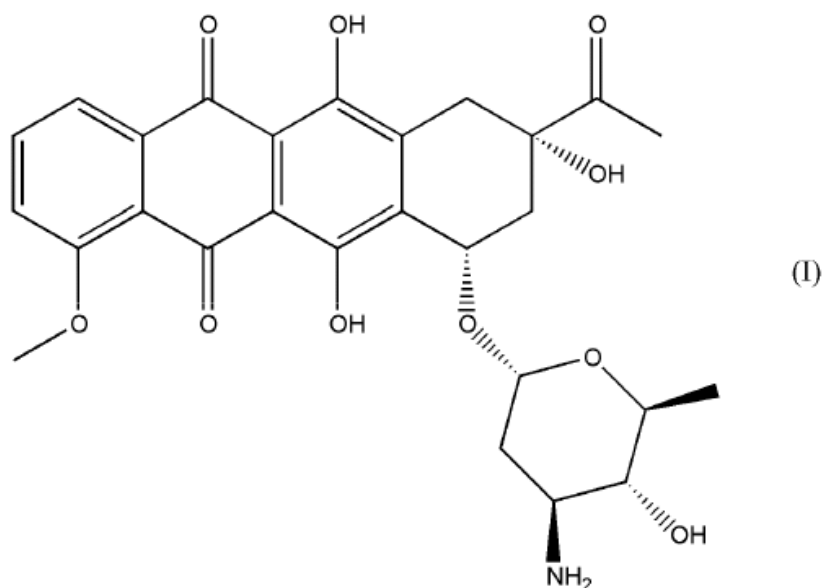
## DESCRIPCIÓN

## Purificación de epidaunorubicina

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de epidaunorubicina, en particular la separación de epidaunorubicina y epi-feudomicina, tal como se da en la producción biotecnológica de epidaunorubicina como producto secundario.

10 La epidaunorubicina es un 4'-epímero de la daunorubicina que pertenece al grupo de los glicósidos y representa un antibiótico del grupo de las antraciclinas. Sirve principalmente como precursor de la epirubicina, que se emplea como citostático en la quimioterapia de cáncer de mama, linfomas no Hodgkin, sarcomas, carcinomas de estómago y otros tipos de cáncer sólidos. La epidaunorubicina puede producirse de manera sintética, semisintética y biotecnológica. Se produce de manera biotecnológica con ayuda de distintas cepas de *Streptomyces peucetius*. La epidaunorubicina puede representarse mediante la siguiente fórmula general (I):

15



20 Durante la síntesis microbiana de la epidaunorubicina surge el problema de que además del producto deseado se forma, entre otros, epi-feudomicina como producto secundario que, debido a la similitud estructural, solo puede separarse con dificultad de la epidaunorubicina. La presencia del producto secundario repercute de manera desventajosa en el rendimiento y el grado de pureza de la epirubicina formada a partir de la epidaunorubicina en una etapa de procedimiento adicional. Habitualmente, la separación y purificación de la epidaunorubicina a partir del caldo de fermentación tiene lugar por medio de extracción líquido-líquido, cromatografía y cristalización.

25 No obstante, esto está relacionado con un coste elevado y una pérdida relativamente grande de epidaunorubicina debido a la presencia de la epi-feudomicina.

30 El documento EP 1 990 405 A1 describe distintas cepas microbianas que son adecuadas para la producción biotécnica de epidaunorubicina. La separación de la epidaunorubicina del caldo de fermentación tiene lugar mediante extracción con cloroformo a un valor de pH alcalino. La mezcla bruta obtenida se purifica adicionalmente por cromatografía a continuación con cloroformo como fase móvil. En una última etapa se cristaliza la epidaunorubicina mediante adición de butanol y ajuste de valor de pH ácido.

35 El documento EP 2 301 943 B1 describe la cristalización de la epidaunorubicina en forma de su sal de clorhidrato a partir de una mezcla de alcohol/cloroformo, teniendo lugar la adición del alcohol a 60 °C.

El documento EP 0 030 295 B1 divulga la producción sintética de epidaunorubicina.

40 El documento WO 2010/028667 describe la obtención de 13-DHED, epidaunorubicina y epi-feudomicina a partir de un caldo de fermentación con ayuda de una resina de intercambio.

45 El documento EP 2 042 608 B1 describe la extracción de agliconas a partir de un caldo de fermentación que contiene 13-DHED, epidaunorubicina y feudomicina. A este respecto, los glicósidos se extraen por medio de cloroformo a partir de la fase acuosa a un valor de pH ligeramente básico. El valor de pH se mantiene estable a este respecto con ayuda de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>.

Los procedimientos habituales para la purificación de epidaunorubicina a partir del caldo de fermentación están relacionados con un coste técnico y financiero elevado. En particular la separación de epidaunorubicina y epi-feudomicina resulta muy difícil debido a la similitud estructural de los dos compuestos, de modo que puede conseguirse un grado de pureza aceptable de la epidaunorubicina solo en relación con una pérdida de rendimiento considerable. Debido a la difícil separación de la epi-feudomicina, esta impureza se encuentra también en los productos secundarios de la epidaunorubicina, lo que repercute en particular de manera perturbadora en la conversión en epirubicina. Por otro lado, un alto grado de pureza y un alto rendimiento son decisivos para la conversión adicional de epidaunorubicina en epirubicina.

Por lo tanto, existe la necesidad de procedimiento que permite una separación efectiva del producto secundario epi-feudomicina del producto deseado epidaunorubicina, sin que se reduzca significativamente el rendimiento de epidaunorubicina por las etapas de separación y purificación.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que permite una separación efectiva de epidaunorubicina y epi-feudomicina después de la producción microbiana, estando aumentado el rendimiento de epidaunorubicina purificada con respecto a los procedimientos habituales en el estado de la técnica.

El objetivo se consigue mediante el objeto de la reivindicación independiente. Formas de realización preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes.

Un objeto de la presente invención es un procedimiento para la purificación de epidaunorubicina que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una mezcla que contiene epidaunorubicina, epi-feudomicina y al menos un disolvente que contiene halógeno;
- b) ajustar el valor de pH de la mezcla a un intervalo de 5,0 a 7,5;
- c) calentar la mezcla de la etapa b) hasta por encima de 50 °C; y
- d) purificar la epidaunorubicina,

caracterizado por que el porcentaje de alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono en la mezcla en las etapas a) y b) asciende como máximo al 5 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.

Sin estar ligado a una teoría, se supone que en las condiciones del procedimiento de acuerdo con la invención se produce una descomposición selectiva de la epi-feudomicina, cuyos productos de descomposición pueden separarse sin embargo de manera más sencilla de la epidaunorubicina deseada. Se supone que en el procedimiento de acuerdo con la invención se produce además una conversión de la mezcla de reacción y debido a esto una disminución de la epi-feudomicina. Ensayos de espectrometría de masas sugieren que el azúcar se escinde y el anillo restante se aromatiza. Se asume además que a este respecto se trata de una descomposición específica de la epi-feudomicina, dado que no podían detectarse productos de degradación de epidaunorubicina. En este sentido, la descomposición que tiene lugar en el procedimiento de acuerdo con la invención se diferencia de la hidrólisis ácida convencional de las antracinas, por las que también estaría afectada la epidaunorubicina.

El procedimiento de acuerdo con la invención parte de epidaunorubicina como material de partida, que se purifica en distintas etapas. A este respecto el origen y el tipo de producción de la epidaunorubicina no están limitados adicionalmente. De este modo, puede emplearse por ejemplo epidaunorubicina comercialmente disponible, que contiene un porcentaje de epi-feudomicina que la hace inadecuada para otras aplicaciones.

En una forma de realización preferida del procedimiento de purificación de acuerdo con la invención, la epidaunorubicina de la mezcla en la etapa a) se obtiene por medio de métodos biotecnológicos, por ejemplo mediante microorganismos adecuados. A este respecto, la epidaunorubicina se encuentra preferentemente junto con epi-feudomicina en el caldo de fermentación. Microorganismos adecuados son por ejemplo bacterias del grupo de las actinobacterias, sobre todo cepas del grupo de *Streptomyces sp.*, por ejemplo *S. peucetius*, *S. coeruleoidus*, *S. griseus*, *Streptomyces sp. C5*, *S. peicetius var. caesius* y *S. bifurcus*. Igualmente pueden usarse cepas modificadas o mutantes.

Preferentemente la epidaunorubicina y la epi-feudomicina de la mezcla en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención se obtienen mediante extracción del caldo de fermentación. La extracción puede comprender a este respecto varias etapas, por ejemplo la extracción por medio de una resina polimérica adecuada seguido de una extracción de líquido. La mezcla a) se obtiene preferentemente a partir del concentrado concentrado de la extracción de líquido del caldo de fermentación y dado el caso mediante adición del disolvente que contiene halógeno.

En una forma de realización especialmente preferida, la mezcla de partida en la etapa a) presenta un valor de pH básico, de manera especialmente preferente un valor de pH en un intervalo de 8 a 10,5.

La epidaunorubicina se encuentra en la mezcla a) en forma disuelta en presencia de al menos un disolvente que contiene halógeno. En una forma de realización preferida, el disolvente que contiene halógeno se selecciona del

grupo de los disolventes clorados, en particular cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).

El contenido en alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono en la mezcla de las etapas a) y b) del procedimiento de acuerdo con la invención asciende como máximo al 5 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.

Se ha mostrado sorprendentemente que un contenido mayor en alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono lleva a una velocidad de reacción disminuida, lo que repercute a su vez en el grado de pureza de la epidaunorubicina.

Por lo tanto, se prefiere una forma de realización de la presente invención en la que el porcentaje de alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono en la mezcla de las etapas a) y b) asciende como máximo al 4 % en volumen, de manera especialmente preferente del 0,1 al 4 % en volumen, en especial del 1,0 al 3 % en volumen, en cada caso con respecto al volumen total de la mezcla. Un contenido en alcohol en el intervalo de acuerdo con la invención indicado garantiza que la epidaunorubicina permanece por completo en disolución y la reacción transcurre en un margen de tiempo satisfactorio.

Además se prefiere una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que el alcohol con 1 a 5 átomos de carbono se selecciona del grupo que consiste en metanol, butanol, propanol, etanol, isopropanol, pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2,2-dimetilpropanol e isobutanol. En especial se prefiere una forma de realización en la que el alcohol con 1 a 5 átomos de carbono es metanol.

Además se prefiere una forma de realización en la que el porcentaje de agua en la mezcla en la etapa a) asciende como máximo al 1 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.

Se descubrió sorprendentemente además que la epidaunorubicina obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la invención presenta un grado de pureza especialmente alto cuando la concentración de la epidaunorubicina en la mezcla de la etapa a) no asciende a más de 13 g/l.

Por lo tanto, se prefiere una forma de realización en la que la concentración de la epidaunorubicina en la mezcla en la etapa a) asciende como máximo a 13 g/l, preferentemente de 6 a 13 g/l, en particular de 8 a 13 g/l. Se ha mostrado que pueden evitarse reacciones secundarias y alteraciones indeseadas de la reacción, cuando la concentración de la epidaunorubicina en la mezcla en la etapa a) se encuentra en el intervalo indicado. De este modo pudo reducirse por ejemplo el riesgo de una precipitación de la epidaunorubicina. Una precipitación de la epidaunorubicina lleva a una pérdida de rendimiento indeseada, dado que la epidaunorubicina precipitada se extrae del proceso de purificación. Además se observó que junto con la epidaunorubicina también precipita la impureza que va a separarse epi-feudomicina, de modo que la precipitación no representa un método de purificación adecuado.

De acuerdo con la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención para la purificación de epidaunorubicina, el valor de pH de la mezcla se ajusta a un intervalo de 5,0 a 7,5. Se ha mostrado sorprendentemente que se produce una descomposición de la epidaunorubicina cuando el valor de pH se encuentra por encima del intervalo de acuerdo con la invención. Si el valor de pH se vuelve demasiado ácido, es decir se ajusta a un valor de 5, se produce una protonación parcial indeseada de la epidaunorubicina, lo que lleva a que la epidaunorubicina precipite junto con la feudomicina y se extrae al desarrollo de proceso adicional.

Preferentemente, el ajuste del valor de pH de la mezcla a un intervalo de 5,0 a 7,5 tiene lugar con ayuda de un ácido que dispone de un valor de pKa adecuado y al mismo tiempo de una buena solubilidad en el disolvente que contiene halógeno, en particular cloroformo. En una forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el ajuste del valor de pH de la mezcla en la etapa b) tiene lugar con ayuda de uno o varios ácidos, preferentemente de un ácido orgánico, de manera especialmente preferente ácido acético.

Además se prefiere una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que la cantidad del ácido asciende a del 0,05 al 0,3 % en volumen, preferentemente del 0,1 al 0,25 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla. Después de la adición del ácido pudo observarse un aumento claro de la velocidad de reacción. El contenido en ácido se encuentra por el contrario por encima del 0,3 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla, pueden producirse problemas de solubilidad que llevan a que la epidaunorubicina y la epi-feudomicina precipiten en la solución y así se extraigan del proceso adicional.

En una forma de realización especialmente preferida el ácido, que se usa para ajustar el valor de pH de la mezcla, se disuelve antes de la adición en un alcohol con 1 a 5 átomos de carbono, preferentemente metanol. Tal como se ha mostrado sorprendentemente, de esta manera pueden evitarse problemas respecto a la solubilidad de la epidaunorubicina e impedirse una precipitación de la epidaunorubicina. A este respecto, el contenido total en alcohol con 1 a 5 átomos de carbono, en particular metanol, en la mezcla no superará el valor de acuerdo con la invención del 5 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.

De acuerdo con la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención para la purificación de epidaunorubicina, la mezcla de la etapa b), tras ajustar el valor de pH, se calienta hasta el intervalo de acuerdo con la invención, hasta por encima de 50 °C. Se descubrió sorprendentemente que la purificación puede acelerarse cuando la mezcla se

calienta hasta una temperatura por encima de 25 °C.

Preferentemente tiene lugar un calentamiento de la mezcla hasta una temperatura que corresponde al punto de ebullición del disolvente que contiene halógeno. Han resultado especialmente adecuadas a este respecto las temperaturas de acuerdo con la invención de por encima de 50 °C, dado que a partir de esta temperatura pudo observarse un claro aumento de la velocidad de reacción.

Por lo tanto, se prefiere una forma de realización en la que la mezcla en la etapa c) se calienta hasta una temperatura en un intervalo de 55 a 75 °C, preferentemente de 60 a 65 °C.

En una forma de realización preferida, la mezcla en el procedimiento de acuerdo con la invención se agita durante un periodo de tiempo determinado a una temperatura superior a 25 °C, preferentemente a una temperatura superior a 35 °C, en especial en un intervalo de 60 a 65 °C. A este respecto, el periodo de tiempo se encontrará en un margen que permite una realización eficiente y optimizada en el tiempo del procedimiento de acuerdo con la invención, consiguiéndose al mismo tiempo un grado de pureza satisfactorio de la epidaunorubicina.

En consecuencia, se prefiere una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que la mezcla en la etapa c) se agita durante un periodo de tiempo de como máximo 48 horas, preferentemente durante un periodo de tiempo de 10 a 30 horas, de manera especialmente preferente de 15 a 25 horas. Una duración de reacción superior a 48 horas ha resultado ser desventajosa desde el punto de vista de la técnica de procesos, mientras que en el caso de una duración de reacción inferior a 10 horas, se valoró que era insuficiente la disminución del porcentaje de epi-feudomicina en la mezcla. Se prefiere especialmente una forma de realización, en la que la mezcla en la etapa c) se agita hasta que el contenido total en epi-feudomicina es inferior al 1 % en peso, con respecto al peso total de la epidaunorubicina, siempre que no se supere una duración de reacción de 48 horas. La cantidad de epi-feudomicina en la mezcla puede determinarse a este respecto por ejemplo por medio de procedimientos de cromatografía normalizados, tal como RP-18 HPLC.

Tal como se describe en la etapa d) del procedimiento de acuerdo con la invención, la epidaunorubicina se purifica. Esta purificación tiene lugar preferentemente hasta un instante en el que el contenido total en epi-feudomicina ha bajado por debajo de un valor límite del 1 % en peso, con respecto al peso de la epidaunorubicina, determinado por medio de cromatografía analítica. Más preferentemente, la purificación de la epidaunorubicina en la etapa d) tiene lugar por medio de extracción acuosa.

Durante la purificación de la epidaunorubicina en la etapa d) ha resultado ser ventajoso cuando la extracción acuosa de la epidaunorubicina en la etapa d) se lleva a cabo de manera alcalina. Por lo tanto, se prefiere una forma de realización en la que la extracción acuosa de la epidaunorubicina en la etapa d) del procedimiento de acuerdo con la invención tiene lugar a un valor de pH de 8 a 10, preferentemente de 8,5 a 9,5. El ajuste del valor de pH puede tener lugar por ejemplo con ayuda de amoniaco, habiendo resultado especialmente ventajoso cuando este contiene aproximadamente el 0,5 - 1,5 % en peso de NaCl, así por ejemplo el 1 % en peso de NaCl, para impedir una transferencia parcial de la epidaunorubicina desde la fase orgánica a la fase acuosa. La cantidad necesaria de amoniaco para ajustar el valor de pH deseado, puede variar y depende de la cantidad de ácido que va a añadirse. De este modo, la cantidad de amoniaco que se necesita, puede ascender por ejemplo a 2,5 veces la cantidad de ácido en gramos.

Un alto grado de pureza de la epidaunorubicina es esencial para una conversión adicional de la epidaunorubicina en epirubicina, dado solo así puede aumentarse su rendimiento. Por lo tanto, se prefiere una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que a la etapa d) le sigue una etapa adicional e), tratándose en el caso de la etapa e) de una purificación cromatográfica de la epidaunorubicina. A este respecto la purificación cromatográfica tiene lugar preferentemente con gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) como fase estacionaria, mientras que como fase móvil se usa preferentemente una mezcla de metanol y cloroformo. Esto tiene la ventaja de que no ha de efectuarse ningún cambio del disolvente, lo que contribuye a su vez a la eficiencia aumentada del procedimiento de acuerdo con la invención.

Se descubrió sorprendentemente que la carga de la columna cromatográfica con epidaunorubicina, que se purificó según el procedimiento de acuerdo con la invención, en comparación con epidaunorubicina, que se purificó según los procedimientos convencionales, pudo aumentarse sin que se observara un empeoramiento del rendimiento de separación. Aquí hay otra ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención, dado que una mayor carga de la columna con un rendimiento de separación constante, permite un desarrollo del proceso más eficiente y económico. De este modo se ha mostrado sorprendentemente que la carga de la columna con epidaunorubicina, que se purificó de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención, pudo aumentarse hasta el 7 % en peso, con respecto al peso seco de la matriz de columna, mientras que en el caso de procedimientos convencionales, la carga máxima de la columna se encuentra en aproximadamente el 4 % en peso.

Además se prefiere una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que la epidaunorubicina de la etapa e) se somete a procedimientos de purificación adicionales, por ejemplo a una cristalización. A este respecto, la cristalización puede tener lugar por ejemplo en forma de la sal de clorhidrato. En

este sentido se ha mostrado que la calidad de la epidaunorubicina purificada de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención era ya después de una etapa de cristalización tan alta que pudo prescindirse de la segunda etapa de cristalización habitual en los procedimientos de separación convencionales según el estado de la técnica.

5 Se prefiere especialmente una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una mezcla que contiene epidaunorubicina, epi-feudomicina y al menos un disolvente que contiene halógeno, preferentemente cloroformo, encontrándose el porcentaje de feudomicina por encima del 1 % en peso, con respecto al peso total de epidaunorubicina y epi-feudomicina;
- 10 b) ajustar el valor de pH de la mezcla a un intervalo de 5,0 a 7,5;
- c) calentar la mezcla de la etapa b) hasta una temperatura en un intervalo de 55 a 75 °C, preferentemente de 60 a 65 °C;
- d) purificar la epidaunorubicina, preferentemente por medio de extracción acuosa;
- 15 e) purificación cromatográfica de la epidaunorubicina de la etapa d), ascendiendo el porcentaje de alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono en la mezcla de las etapas a) y b) a del 0,1 al 4 % en volumen, preferentemente del 1,0 al 3,0 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla, y ascendiendo el porcentaje de agua en la mezcla en la etapa a) como máximo al 1 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.

20 Es más preferida una forma de realización, en la que el procedimiento de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una mezcla que contiene epidaunorubicina, epi-feudomicina y al menos un disolvente que contiene halógeno, preferentemente cloroformo, encontrándose el porcentaje de epi-feudomicina por encima del 1 % en peso, con respecto al peso total de epidaunorubicina y epi-feudomicina, y encontrándose la concentración de la epidaunorubicina en un intervalo de 6 a 13 g/l;
- 25 b) ajustar el valor de pH de la mezcla a un intervalo de 5,0 a 7,5;
- c) calentar la mezcla de la etapa b) hasta una temperatura en un intervalo de 55 a 75 °C, preferentemente de 60 a 65 °C;
- 30 d) purificar la epidaunorubicina por medio de extracción acuosa, encontrándose el valor de pH de la mezcla de extracción en un intervalo de 8 a 10, preferentemente de 8,5 a 9,5;
- e) purificación cromatográfica de la epidaunorubicina de la etapa d),

35 ascendiendo el porcentaje de alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono en la mezcla de las etapas a) y b) a del 0,1 al 4 % en volumen, preferentemente del 1,0 al 3,0 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla, y ascendiendo el porcentaje de agua en la mezcla en la etapa a) como máximo al 1 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.

40 En una forma de realización preferida, las etapas de procedimiento individuales a) a e) no son intercambiables. De manera especialmente preferente, el procedimiento tiene lugar en el orden establecido.

La presente invención se explicará en detalle por medio de los siguientes ejemplos, no debiendo entenderse estos en modo alguno como limitación de la idea de la invención.

45 **Ejemplos:**

Ejemplo 1:

50 La concentración de epidaunorubicina en una mezcla que contiene cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), epidaunorubicina y epi-feudomicina se ajustó por medio de destilación a un contenido de 8 a 12 g/l. Una mezcla de partida correspondiente puede obtenerse por ejemplo mediante separación de la fase de cloroformo a partir del caldo de fermentación. A la solución concentrada (128 l) se añadieron 194 g de ácido acético (al 0,15 % en volumen) y 2,4 kg de metanol (al 2 % en volumen), refiriéndose los datos del % en volumen en cada caso al volumen total de la solución, y ajustándose el valor de pH así a un intervalo de 5,0 a 7,5. La solución obtenida se calentó hasta 60 a 65 °C y se agitó durante 17

55 horas en este intervalo de temperatura. Después se enfrió la mezcla hasta 25 °C y se determinó el contenido de la impureza epi-feudomicina, con respecto al peso de epidaunorubicina por medio de HPLC analítica (RP18-HPLC) e integración del pico medido. El resultado se muestra en la Tabla 1.

60 El Ejemplo 2 sirve como ejemplo comparativo y muestra el resultado de una purificación convencional de la epidaunorubicina, en la que se prescindió del calentamiento de la mezcla hasta una temperatura de 60 a 65 °C y de la adición de ácido acético. Los datos de la epi-feudomicina se refieren en cada caso a la cantidad de epidaunorubicina.

Tabla 1

Ejemplo	epi-Feudomicina (%)
1	0,6
2 (Comp.)	3,3

5 Tal como se desprende de la Tabla 1, por medio del procedimiento de acuerdo con la invención pudo conseguirse un grado de pureza claramente mayor de la epidaunorubicina, que se refleja en un menor porcentaje de epi-feudomicina.

10 En una etapa adicional, la epidaunorubicina purificada según el procedimiento de acuerdo con la invención se trató adicionalmente por medio de extracción acuosa a un valor de pH de 8 a 9 y purificación cromatográfica posterior. A este respecto se sometieron a prueba distintas cantidades de carga de la columna. Las fracciones obtenidas con la purificación cromatográfica se reunieron y se determinó el grado de pureza de la epidaunorubicina así como el porcentaje de epi-feudomicina. Los resultados están representados en la Tabla 2. A este respecto, la carga de la columna se refiere a la relación en peso de epidaunorubicina con respecto al peso seco de la matriz de columna, multiplicado por 100%.

15 Tabla 2

Ejemplo	Carga (%)	Pureza (%)	Rendimiento (%)	Porcentaje de epi-feudomicina (%)
3	5,1	91	87	0,3
4	5,8	86	97	0,2
5	7,2	90	97	0,2

Tal como se desprende de la Tabla 2, no solo permanece constante el rendimiento de separación también con una carga elevada de la columna, sino que incluso pudo aumentarse.

20 La Tabla 3 muestra los resultados de ensayos en los que se varió la cantidad de ácido acético que se usó para el ajuste del valor de pH. Tal como se desprende de la Tabla 3, el porcentaje de epi-feudomicina disminuye con una cantidad creciente de ácido. Como disolvente se usó cloroformo. Las mezclas contenían en cada caso el 1 % en volumen de metanol y se agitaron en cada caso a 60 °C durante 25 horas, antes de que se determinara el porcentaje de epi-feudomicina.

25 El porcentaje de epi-feudomicina en la mezcla de partida ascendió al 8,7%. En el caso del Ejemplo 6 se trata de un Ejemplo comparativo, en el que a la mezcla no se agregó ácido acético.

Tabla 3

Ejemplo	Ácido acético (% en volumen)	epi-Feudomicina(%)
6	0	7,7
7	0,1	3,3
8	0,2	1,9
9	0,3	1,3
10	0,5	0,8

30 Tal como muestra la Tabla 3, ya la adición del 0,1 % en volumen de ácido acético a una mezcla que contiene cloroformo, epidaunorubicina, epi-feudomicina y el 1 % en volumen de metanol lleva a una clara disminución de la impureza epi-feudomicina con una duración de reacción de 25 horas a una temperatura de 60 °C. Por lo tanto puede aumentarse el grado de pureza de la epidaunorubicina obtenida sin que se produzcan pérdidas en el rendimiento debido a métodos de purificación costosos.

35 Tal como se desprende de los Ejemplos descritos, el procedimiento de acuerdo con la invención no lleva a un grado de pureza claramente mayor de la epidaunorubicina en comparación con los métodos de purificación convencionales, sino que permite también un aumento de la eficiencia y economía del proceso de purificación mediante una mayor carga de columna con un rendimiento de separación al menos constante así como la reducción de las etapas de proceso necesarias, tal como por ejemplo prescindiendo de una segunda etapa de cristalización.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de epidaunorubicina que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) proporcionar una mezcla que contiene epidaunorubicina, epi-feudomicina y al menos un disolvente que contiene halógeno;  
 b) ajustar el valor de pH de la mezcla a un intervalo de 5,0 a 7,5;  
 c) calentar la mezcla de la etapa b) hasta por encima de 50 °C; y  
 d) purificar la epidaunorubicina,
- 10 **caracterizado por que** el porcentaje de alcoholes con 1 a 5 átomos de carbono en la mezcla en las etapas a) y b) asciende como máximo al 5 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el porcentaje de agua en la mezcla en la etapa a) asciende como máximo al 1 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** el alcohol con 1 a 5 átomos de carbono se selecciona del grupo que consiste en metanol, butanol, isopropanol, etanol, propanol, pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2,2-dimetilpropanol e isobutanol.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la concentración de la epidaunorubicina en la etapa a) asciende a de 6 a 13 g/l, preferentemente de 8 a 13 g/l.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el disolvente que contiene halógeno se selecciona del grupo de los disolventes clorados, en particular cloroformo (CHCl<sub>3</sub>).
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el ajuste del valor de pH en la etapa b) tiene lugar con ayuda de uno o varios ácidos, preferentemente de un ácido orgánico, de manera especialmente preferente ácido acético.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** la cantidad del ácido asciende a del 0,1 al 0,3 % en volumen, preferentemente del 0,15 al 0,25 % en volumen, con respecto al volumen total de la mezcla.
- 45 8. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** la mezcla en la etapa c) se calienta hasta una temperatura en un intervalo de 55 a 75 °C, preferentemente de 60 a 65 °C.
9. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** la mezcla en la etapa c) se agita durante un periodo de tiempo de como máximo 48 horas, preferentemente durante un periodo de tiempo de 10 a 30 horas, de manera especialmente preferente de 15 a 25 horas.
10. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** la purificación de la epidaunorubicina en la etapa d) tiene lugar por medio de extracción acuosa.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** la extracción acuosa de la epidaunorubicina en la etapa d) tiene lugar a un valor de pH de 8 a 10, preferentemente de 8,5 a 9,5.
12. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** a la etapa d) le sigue una etapa adicional e), tratándose en el caso de la etapa e) de una purificación cromatográfica de la epidaunorubicina.